©Biologiezentrum Linz, Austria, download www.biologiezentrum.at

Trüffel – von einer geheimnisumwitterten Delikatesse zum Modell der Ektomykorrhizaforschung

Alexander Urban*

Abstract: A brief intruction to the biology, ecology, evolution, phylogenetic diversity, biogeography and ethnomycology of true truffles (genus *Tuber*) and hypogeous fungi in general is given. New insights from molecular phylogenetic, genomic and biochemical studies are summarised. The potentials of truffle cultivation for sustainable agroforestry are presented.

Zusammenfassung: Einleitend werden Aspekte der Biologie, Ökologie, Evolution, der phylogenetischen Diversität, Biogeographie und Ethnomykologie der Gattung *Tuber* (Trüffel im engeren Sinn) sowie der Hypogäen im allgemeinen umrissen. Es folgt eine Zusammenfassung neuer molekular-phylogenetischer, genomischer und biochemischer Erkenntnisse. Abschließend werden Perspektiven der Trüffelkultur, einer Form der Agroforstwirtschaft diskutiert.

Key words: symbiosis, mycorrhiza, zoochory, truffle cultivation.

*Correspondence to: alexander.urban@univie.ac.at

Address: Fakultät für Lebenswissenschaften, Department für Botanische Systematik und Evolutionsforschung, Universität Wien, Rennweg 14, A-1030 Wien, Austria.

Netzwerker im Verborgenen

Trüffel im mykologischen Sinn sind Arten der Gattung *Tuber*, Schlauchpilze (Askomyzeten), die ihre Fruchtkörper im Boden ausbilden. Die verborgene Art der Fruchtkörperbildung haben Trüffel mit anderen, meist nicht näher verwandten Pilzgattungen gemein, die Sammelbezeichnung für diese Pilze lautet „Hypogäen" (griechisch: hypo – unter; gaia – Erde). Während manche Autoren die unterirdische Fruchtkörperbildung für ein ursprüngliches Merkmal der Hypogäen hielten, haben stammesgeschichtliche Forschungen gezeigt, dass die meisten Hypogäengattungen von epigäischen Pilzgruppen abstammen. Der Übergang zur unterirdischen Fruchtkörperbildung erfolgte in sehr unterschiedlichen Verwandtschaftsgruppen der Schlauchpilze (Ascomycota) und Ständerpilze (Basidiomycota), und ging mit ähnlichen morphologischen und funktionellen Adaptationen einher, es handelt sich um konvergente Evolution. (Abb. 1)

Während sich die Fruchtkörperformen bei den Hypogäen vereinfacht und der Kugelform angenähert haben, ist die Vielfalt der Sporenformen außergewöhnlich hoch. Die Bestimmung der Arten basiert daher in der Regel auf mikroskopischer Analyse (Abb. 2).

©Biologiezentrum Linz, Austria, download www.biologiezentrum.at

Abb.1: Hypogäen (untere Reihe) und ihre epigäischen Verwandte (obere Reihe). (a) Hochgerippte Becher-Lorchel (*Helvella acetabulum*, Foto: Sava Krstic), (b) Burgunder-Trüffel (*Tuber aestivum* f. *uncinatum*), (c) Dünen-Stinkmorchel (*Phallus hadriani*), (d) Schwanztrüffel (*Hysterangium* sp., Foto: Michael Castellano), (e) Espen-Rotkappe (*Leccinum aurantiacum,* Foto: Tatiana Bulyonkova), (f) Sternsporige Laubtrüffel (*Octavianina asterosperma*).

©Biologiezentrum Linz, Austria, download www.biologiezentrum.at

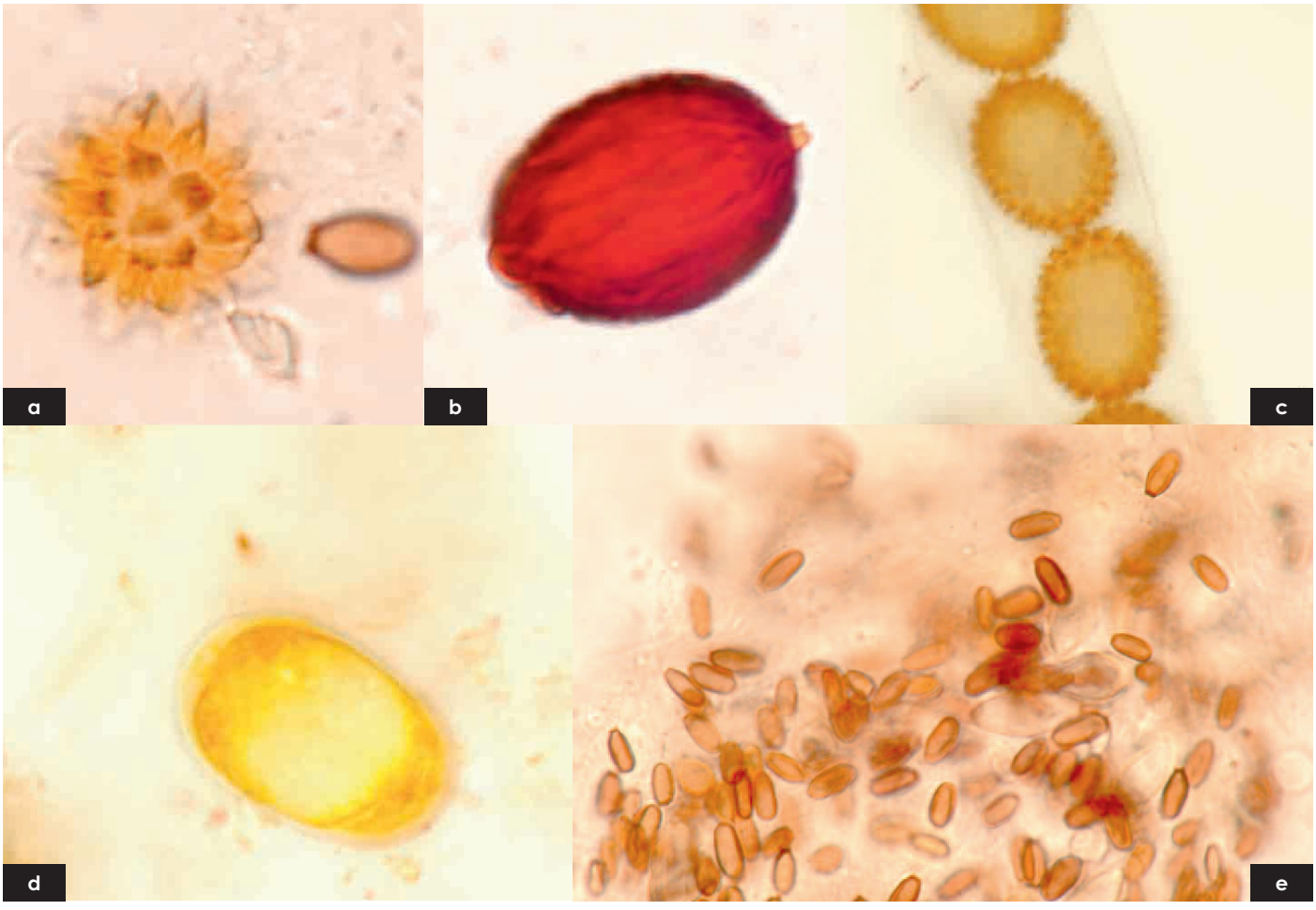

Abb. 2: Hypogäensporen isoliert aus Fäzes von Kleinsäugern. (a) *Octavianina asterosperma*, (b) *Chamonixia caespitosa*, (c) cf. *Genea* sp., (d) *Balsamia* sp. (e) *Melanogaster broomeianus*. Fotos: Susanne Schickmann.

Das vielleicht auffälligste Merkmal der meisten Hypogäen ist ihr durchdringender Geruch, der je nach Art sehr unterschiedlich sein kann. Das einzigartige Duftuniversum der Trüffel ist nicht nur Grundlage ihrer kulinarischen Wertschätzung, sondern auch Schlüssel zum Verständnis eines wesentlichen Teils ihres Lebenszyklus (Abb. 3 und 4): Denn die Sporenverbreitung erfolgt bei den Hypogäen nicht wie bei den meisten anderen Pilzen durch den Wind, sondern durch Tiere die an den Trüffeln fressen. Die Trüffel werden von den Mykophagen anhand des charakteristischen Geruchs geortet und zumindest teilweise verzehrt, die Trüffelsporen passieren den Verdauungstrakt ihres Vektors unbeschadet, und werden als Bestandteil des Kots wieder ausgeschieden, idealerweise in der Nähe eines geeigneten Wirtsbaumes. Die Ausbreitung der Hypogäen-Sporen durch Mykophagie ist also der Samenausbreitung durch Frugivorie (beispielsweise durch Vögel) analog. Die meisten Hypogäen sind auf endozoochore Sporen-Ausbreitung spezialisiert, bei Arten mit pulverartigen Sporen kann die Ausbreitung bereits durch Fraß an der Peridie, der sterilen Hüllschicht, erfolgen. Dies gilt beispielsweise für Hirschtrüffel (*Elaphomyces* spp.).

Eine weitere Besonderheit der Hypogäen ist, dass es sich nahezu ausnahmslos um Ektomykorrhizapilze handelt, das heißt sie leben in einer mutualistischen Symbiose mit Wirtspflanzen, in der Regel mit Bäumen. Die Lebensweise der Hypogäen wird also durch zumindest zwei Typen von obligaten mutualistischen Interaktionen bestimmt: Mykophagie und Mykorrhiza. Evolutionsbiologisch lassen sich viele Merkmale der Trüffel wie auch der Hypogäen im allgemeinen auf diese besonderen Lebensumstände zurückführen: Konvergenz der Fruchtkörperform, Verlust des aktiven Sporenabwurfs, Reduktion der Giftigkeit, auffällige Düfte.

In Anbetracht der vielfältigen Abhängigkeiten von Interaktionen mit anderen Organismen mag es überraschen, dass sich die Lebensweise der Hypogäen auf allen Kontinenten mit Ausnahme der Antarktis etabliert hat,

©Biologiezentrum Linz, Austria, download www.biologiezentrum.at

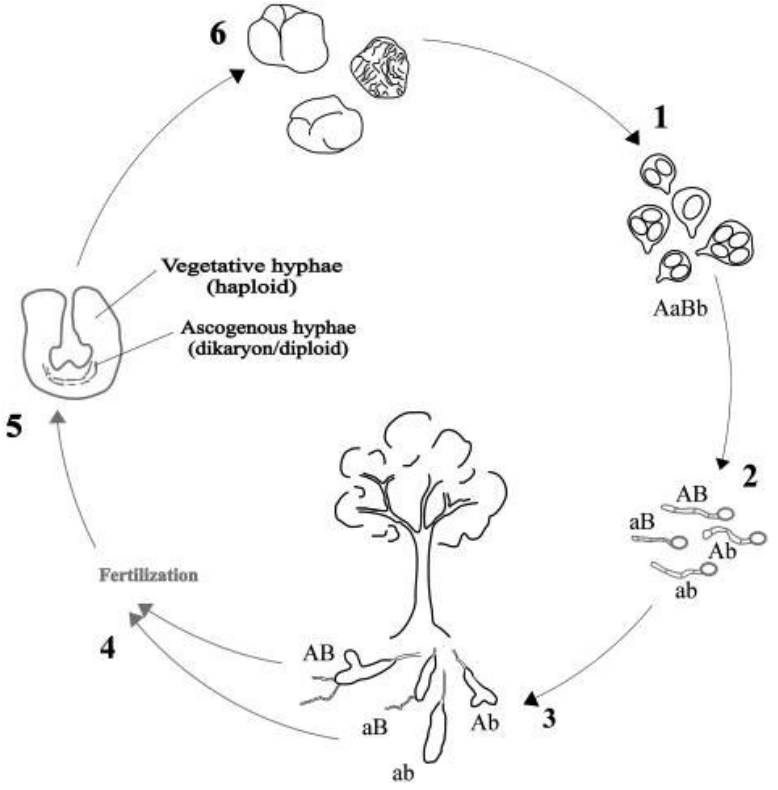

Abb. 3: Revidierter Lebenszyklus der Trüffel (Paolocci et al. 2006).

und dass sehr unterschiedliche Lebensräume erfolgreich kollonisiert wurden: tropische, subtropische, mediterrane, temperate und borealeWälder, Steppen, Wüsten, und auch urbane Habitate (Maser et al. 2008). Im Rahmen eines Forschungsprojektes gelang der Nachweis, dass Kleinsäuger auch in Bergwäldern der Ostalpen, darunter das letzte große Primärwaldgebiet Österreichs im Wildnisgebiet Dürrenstein, eine bedeutende Rolle als Vektoren von Hypogäen spielen. Durch mikroskopische (Abb. 2) und molekular Analyse von Pilzsporen aus Kotproben konnte gezeigt werden dass alle acht im Gebiet vorgefundenen Kleinsäugerarten, darunter auch Spitzmäuse (*Sorex* spp.) und Siebenschläfer (*Glis glis*) eine unerwartet hohe Vielzahl an Hypogäenarten konsumieren. Der mit Abstand höchste Grad an Mykophagie wurde bei der Rötelmaus (*Myodes glareolus*) festgestellt (Schickmann et al. submitted).

Auf manchen Inseln haben sich evolutionäre Sonderwege der Mykophagie entwickelt: Auf Neuseeland beispielsweise spielten Säugetiere vor der menschlichen Besiedelung nur eine sehr untergeordnete Rolle, es gab nur einige wenige Fledermausarten, die terrestrischen Nahrungsnetze wurden von zum Teil riesenhaften Vögeln dominiert. Im Gegensatz zu den meisten Kleinsäugern orientieren sich Vögel bei der Nahrungssuche viel mehr an optischen als an olfaktorischen Signalen. Auf Neuseeland ging die Spezialisierung auf Tierausbreitung bei einigen Pilzarten mit Wachstum in der Streuschicht und der Ausbildung von Signalfarben einher. Interessantereise ähneln die Pilze farblich dem eßbaren, von Vögeln gesuchten Samenmantel (Arillus) der in Neseuland heimischen Steineiben (*Podocarpus* spp.), die Pilze nutzen also optische Mimikry zur Sporenausbreitung.

Die Ausbreitungsstrategie der Hypogäen kann regional sehr erfolgreich sein, die Wahrscheinlichkeit einer Fernverbreitung über Kontinente hinweg ist angesichts der Abhängigkeit von Endozoochorie jedoch gering. Ausbreitungsbarrieren und ökologische Spezialisierung hatten die Entwicklung von regional sehr eigenständigen Hypogäen-Fungen zur Folge. Besonders außerhalb Europas werden laufend neue Hypogäen-Arten beschrieben (z.B. Kinoshita et al. 2011). Auch in Europa, dem Kontinent mit der längsten Forschungstradition (Abb. 5), sind viele Hypogäen-Gattungen revisionsbedürftig, DNA-Daten legen nahe, dass auch bei uns die Diversität noch unzureichend erfasst ist – das gilt auch für die Gattung *Tuber* (Bonito et al. 2010b; Marjanović et al. 2010).

Hinweise auf Hypogäenfunde sind für die weitere Erforschung ihrer Diversität und Verbreitung sehr wertvoll, ich

©Biologiezentrum Linz, Austria, download www.biologiezentrum.at

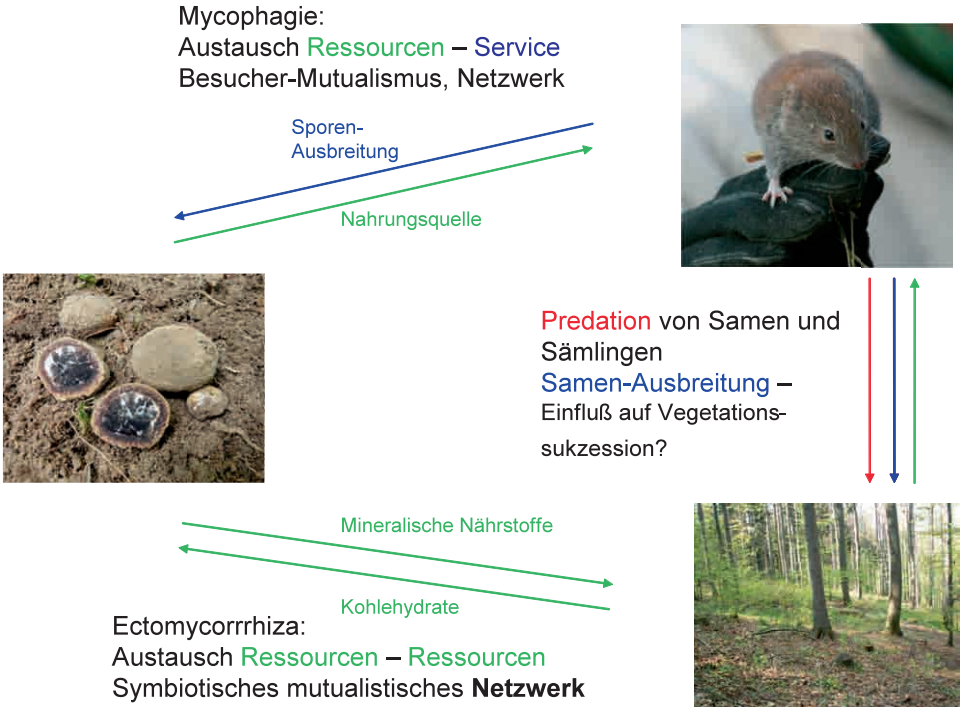

Abb. 4: Mutualistische Interaktionen der Hypogäen mit Bäumen (Ektomykorrhiza) und mit Vektoren (Mykophagie). Die Vektoren, hier Kleinsäuger, stehen auch in Wechselwirkung mit den Wirtsbäumen der Trüffel.

bestimme gerne ihre frischen oder gut getrockneten Aufsammlungen (Kontakt: alexander.urban@univie.ac.at; www.trueffelgarten.at).

Brûlé

Brûlé ("verbrannt") ist der französische Ausdruck für die Verkahlung des krautigen Vegetation im Bereich eines Trüffelmyzels – die italienische Bezeichnung lautet *Pianello*. Innerhalb aktiver *Brûlés* sterben viele Pflanzenarten ab, nur einige wenige können gedeihen (Abb. 6). Die ersten *Brûlés* bilden sich meist einige Jahr der Pflanzung eines mit Trüffel beimpften Setzlings, erste Trüffel wachsen oft ein bis zwei Jahre nach dem ersten Erscheinen der *Brûlés*. Nicht alle Trüffelarten bewirken im gleichen Ausmaß die Ausbildung von *Brûlés*, *T. melanosporum* verursacht sehr ausgeprägte Kahlstellen, *T. magnatum* ist wesentlich diskreter. Mechanismen und Funktion der Formation von *Brûlés* sind nicht restlos geklärt. Es handelt wahrscheinlich sich um eine Art von Parasitismus an nicht-Wirtspflanzen, die auch von Trüffelmyzel kolonisiert werden (Neuner-Plattner et al. 1999). Möglicherweise spielt auch Allelopathie durch volatile oder wasserlösliche Sekundärstoffe eine Rolle (Splivallo et al. 2011). Eine wahrscheinliche Funktion der *Brûlés* liegt in der Verminderung von Wasserkonkurrenz durch nicht-Wirtspflanzen in periodisch trockenen Lebensräumen. Aktive *Brûlés* sind ein Hinweis auf die kräftige Entwicklung des Trüffelmyzels, aber noch keine Erfolgsgarantie, denn auch andere Pilzarten können ähnliche Erscheinungen hervorrufen.

Menschliche Nutzung

Die Kenntnis und Verwendung von Hypogäen ist seit dem Altertum belegt, sehr wahrscheinlich reicht die Suche nach Trüffeln jedoch viel weiter in prähistorische Zeiten zurück. In verschiedenen Erdteilen nutzen die letzten überlebenden Sammler und Jäger, Repräsentanten der ursprünglichsten Wirtschaftsweise der Menschheitsgeschichte, neben vielen anderen natürlichen Ressourcen auch Hypogäen, so die Ureinwohner Australiens (Trappe et al. 2008b) oder die Khoisan, Bewohner der Kalahari im südlichen Afrika, wo *Kalaharituber pfeilii, Eremiomyces echinulatus* und *Mattirolomyces austroafricanus* wachsen (Ferdman et al. 2005; Trappe et al. 2008a).

Auch in Nordafrika und im vorderen Orient ist die Nutzung von "Wüstentrüffeln" (vor allem der Gattungen *Terfezia*

©Biologiezentrum Linz, Austria, download www.biologiezentrum.at

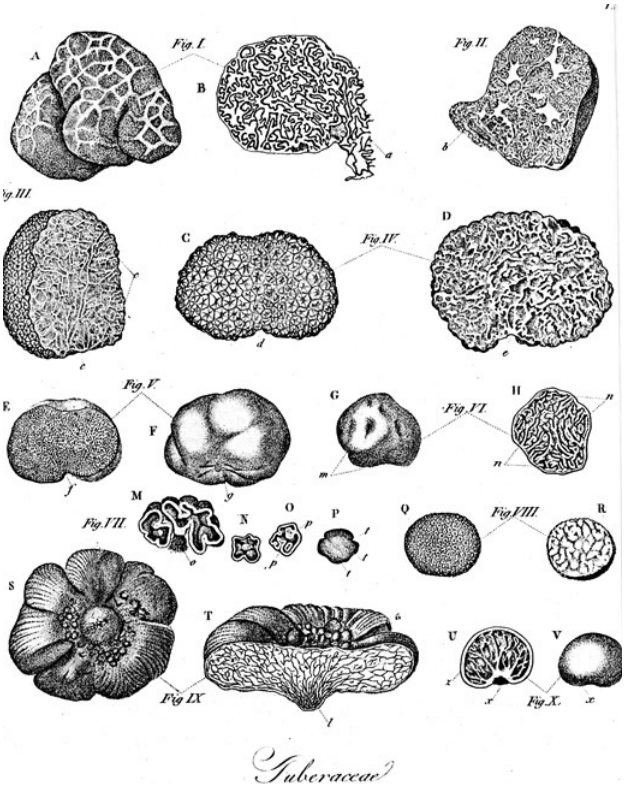

Abb. 5: Carlo Vittadini´s *Monographia Tuberacearum* (1831) legte den Grundstein für die moderne Systematik der Hypogäen.

Abb. 6: Brûlés von *Tuber melanosporum* in einem Trüffelhain.

und *Tirmania*) in der Tradition verwurzelt. Die Erntezeit fällt in das Frühjahr, wenn der Boden noch von den Winter- und Frühjahrsregen befeuchtet ist. Die Wirtspflanzen der "Wüstentrüffel" sind vor allem Zistrosengewächse (Sonnenröschen, *Helianthemum* spp. und andere Gattungen), aber auch Cucurbitaceae (*Citrullus vulgaris*). In Marokko unweit von der Hauptstadt Rabat werden Trüffel durch abklopfen des Bodens mit einem kurzen Stock gesucht (Abb. 7): wo eine Trüffel verborgen ist, hat der Boden einen anderen Klang! In den Anrainerstaaten des Arabischen Golfes haben der rapide soziale Wandel sowie der Verlust an Naturräumen vielfach zu einer beträchtlichen Naturferne geführt. Die Beschäftigung mit "Wüstentrüffeln" wird hier auch als Hinwendung zu den kulturellen Wurzeln der einst von Beduinen gebildeten Gesellschaft gesehen. Man wird sich auch zunehemend der Rolle der Trüffel in der Ökologie der Trockengebiete bewußt. Die Assoziation aus Pflanzenwurzeln und Mykorrhizapilzen ermöglicht Pflanzenwachstum auch unter sehr schwierigen Bedingungen, und hilft beim Schutz des Bodens vor Erosion und gegen die Wüstenbildung. In diesem Sinne ist die Bezeichnung "Wüstentrüffel" irreführend, denn sie ist vielmehr Teil der Lebensgemeinschaften, die die Umwandlung von Trockengebieten in Wüsten eindämmen

Biogeographie, Phylogenie und Diversität der Gattung Tuber

Die Verbreitung strikt endozoochorer Hypogäen ist, zumindest wenn die Fruchtkörper die einzige Quelle von Diasporen bilden, durch den Aktionsradius ihrer Vektoren beschränkt. Der Fernverbreitung über Ozeane oder andere biogegraphische Barrieren ist sehr unwahrscheinlich. Hypogäen sind daher innerhalb der Großpilze ein besonders attraktives Modell für phylogeographische Analysen

Während die Familie Tuberaceae mit den Gattungen *Dingleya*, *Labyrinthomyces* und *Reddelomyces* auch im südlichen Afrika vorkommt (Ferdman et al. 2005; Bonito et al. 2010b), ist die Gattung *Tuber* auf die Nordhemisphäre beschränkt (Jeandroz et al. 2008). Dieses biogeographische Muster bietet Raum für phylogeographische Hypothesen: lag der Ursprung der Tuberaceae noch in Pangäa, also vor dem Aufbrechen des Superkontinents in Gondwana und Laurasia nahe der Trias-Jura Grenze, vor ca 200 Millionen Jahren (Abb. 8).

Die Entwicklung und Diversifizierung der Gattung *Tuber* hingegen blieb auf die Nordhemisphäre, also auf Laurasia beschränkt, dies wird durch das Fehlen der Gattung in der Südhemisphere nahegelegt - einige heute auch in südlichen Breiten vorkommende Arten wurden bewußt eingeführt oder unbeabsichtigt eingeschleppt (Bonito et al.

©Biologiezentrum Linz, Austria, download www.biologiezentrum.at

Abb. 7: "Wüstentrüffel" in Marokko. (a) Trüffelsuche mit einem kurzen Stock in einem typischen Habitat, (b) *Helianthemum* sp., charakteristische Wirtspflanze, (c) *Terfezia* sp., (d) *Tuber oligospermum*, (e) *Delastria rosea*.

©Biologiezentrum Linz, Austria, download www.biologiezentrum.at

2010b). Erst spät in erdgeschichtlicher Zeit, nach der neuerlichen Annäherung Afrikas an Eurasien, wäre sekundär eine Besiedelung der mediterran geprägten Regionen Nordafrikas erfolgt.

Die möglichen paläogeographischen Ausbreitungskorridore innerhalb der Nordhemisphäre sind noch komplexer: Während der Kreidezeit öffnete sich der Südatlantik und trennte Südamerika von Afrika, zwischen Nordamerika und Eurasia blieb hingegen bis zum mittleren Eozän, also bis vor ca. 20 Millionen Jahren, eine Landbrücke bestehen. Dank des milden Klimas während des Kreidezeit erstreckten sich Wälder bis fast zum Nordpol. Im Bereich der Landbrücke waren diese Wälder bis zum Eozän noch überwiegend subtropisch geprägt, um im Oligozän und Miozän einer eher temperaten Waldvegetation Platz zu machen. Diese potenzielle Migrationsroute wurde erst mit der Abspaltung von Nordamerika und Grönland von Europe infolge der Aufweitung des Nordatlantik vor ca. 45 Millionen Jahren unterbrochen (Jeandroz et al. 2008).

Vom mittleren Jura bis zu Beginn des Eozäns teilte die epikontinentale Turgai See Siberien in Nord-Süd Richtung, und bildete eine Barriere zwischen Ostasien und Europa (Akhmetiev & Beniamovski 2009). Im Eozän bestand mit der Beringstraße eine Landbrücke zwischen Ostsibirien und Alaska. Paläoklamatischen Daten zufolge bot die Beringstraße damals ein für Waldbewuchs geeignetes Klima. Vor vermutlich 5-7 Millionen Jahren öffnete sich die Landbrücke, damit verschwand die potenzielle Migrationsroute zwischen Nordamerika und Sibirien (Roberts et al. 2009). Im Pleistozän bestand die Landbrücke nur während der Eiszeiten und bot daher aller Wahrscheinlichkeit nach keine geeigneten Ausbreitungsbedingungen für Trüffelarten.

Das Alters der Gattung *Tuber* wird anhand einer molekularen Datierung auf 140 bis 271 Millionen Jahre geschätzt(Jeandroz et al. 2008), das ist mit der Rekonstruktion der Paläobiogeographie der Tuberaceae vereinbar. Eine Analyse der weltweit verfügbaren ITS DNA Sequenzen der Gattung *Tuber* (Abb. 9) läßt eine Unterteilung in neun Verwandtschaftsgruppen erkennen (Bonito et al. 2010b), von denen zumindest drei (*T. melanosporum*-Gruppe, *T. rufum*-Gruppe und *T. puberulum*-Gruppe) in Europa, Nordamerika und Ostasien vorkommen – die interkontinentale Verbreitung der einzelnen Verwandtschaftsgruppen ist angesichts des aktuellen Erfassungsstandes jedoch noch ebenso unzureichend bekannt wie die tatsächliche Artenzahl. Die Arten der Gattung *Tuber* weisen Areale von sehr unterschiedlicher Größe auf. Bei sehr konservativer Schätzung (4 % Sequenzunterschied in der nrITS (nuclear ribosomal Internal Transcribed Spacer) Region als Kriterium zur Artabgrenzung) lassen sich die analysierten Sequenzen 64 Arten zuordnen, von denen jedoch 36 nicht näher identifiziert sind, da nach aktuellem Wissensstand keine eindeutig Zuordnung zu einer bekannten Art möglich ist (Bonito et al. 2010b). Von den 32 derzeit anerkannten europäischen Trüffelarten (Ceruti et al. 2003) waren im Rahmen dieser Analyse immerhin 21 repräsentiert. Die große Anzahl nicht zuordenbarer Sequenzen unterstreicht die Notwendigkeit einer umfassenden Revision der Gattung, ein Projekt, dass die weltweite Kooperation von Trüffelsammlern und Mykologen erfordert.

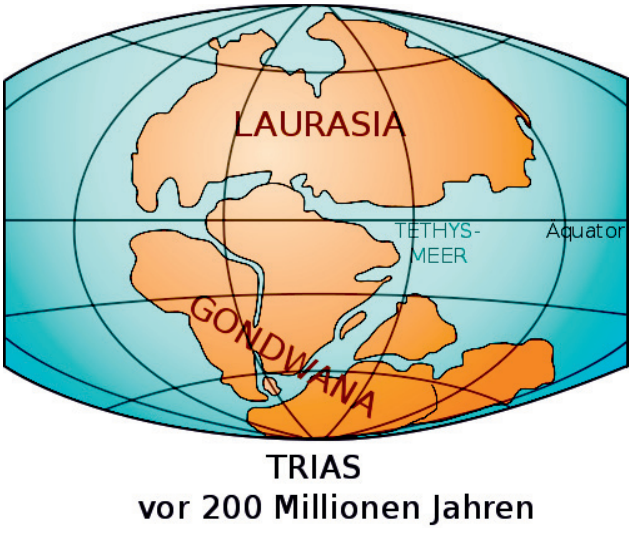

Abb. 8: Aufbrechen von Pangäa in Laurasia und Gonswanaland (copyright: wikimedia commons).

Obwohl in Asien und Nordamerika kulinarisch verwertbare Trüffelarten vorkommen, ist der Marktwert der zwei begehrtesten europäischen Trüffelarten, der Weißen Alba-Trüffel (*Tuber magnatum;* Abb. 10) sowie der Périgordtrüffel (*Tuber melanosporum*) bislang unangefochten – ein Faktum das angesichts der Diversität der Gattung in anderen Kontinenten überrascht. Mengenmäßig wird der Weltmarkt bereits von Trüffeln aus China dominiert. *Tuber indicum,* bei uns als Chinesische Schwarze Trüffel bezeichnet, wird in großen Mengen in Föhrenwäldern an den östlichen Abhängen des Himalaya gesammelte (geschätzte Jahresproduktion 800 t), der Handelswert pro kg liegt jedoch nur bei etwa 1/10 des Wertes der Périgordtrüffel.

Während bei anderen Gattungen von Ektomykorrhizapilzen die Wirtsspezifität ein wesentlicher Faktor der Diversifizierung gewesen sein dürfte, scheint diese für die eher generalistischen Trüffelarten eine untergeordnete Rolle gespielt zu haben. Eine Ausnahme bildet hier jedoch die bislang nur aus Nordamerika bekannte *T. gibbosum*-Gruppe, die auch kulinarisch verwertbare Trüffelarten umfasst: Die Gruppe weist eine Spezialisierung auf Pinaceae und artspezifische Präferenzen für unterschiedliche Wirtsbaumgattungen (*Pseudotsuga, Pinus, Abies; Tsuga, Picea*) auf (Bonito et al. 2010a).

Nicht nur Bäume, auch manche Orchideen, vor allem der Gattungen *Epipactis* und *Cephalanthera*, können mit Trüffelarten wie auch mit anderen EM-Pilzen eine Symbiose eingehen. Diese Verbindung findet sich besonders an schattigen Waldstandorten und kann mit dem teilweisen oder gänzlichen Verlust von Chlorophyll einhergehen. Isotopenuntesuchungen belegen einen einseitigen Nettotransfer von C und N von den Pilzpartnern zu den Orchideen (Bidartondo et al. 2004; Selosse et al. 2004).

©Biologiezentrum Linz, Austria, download www.biologiezentrum.at

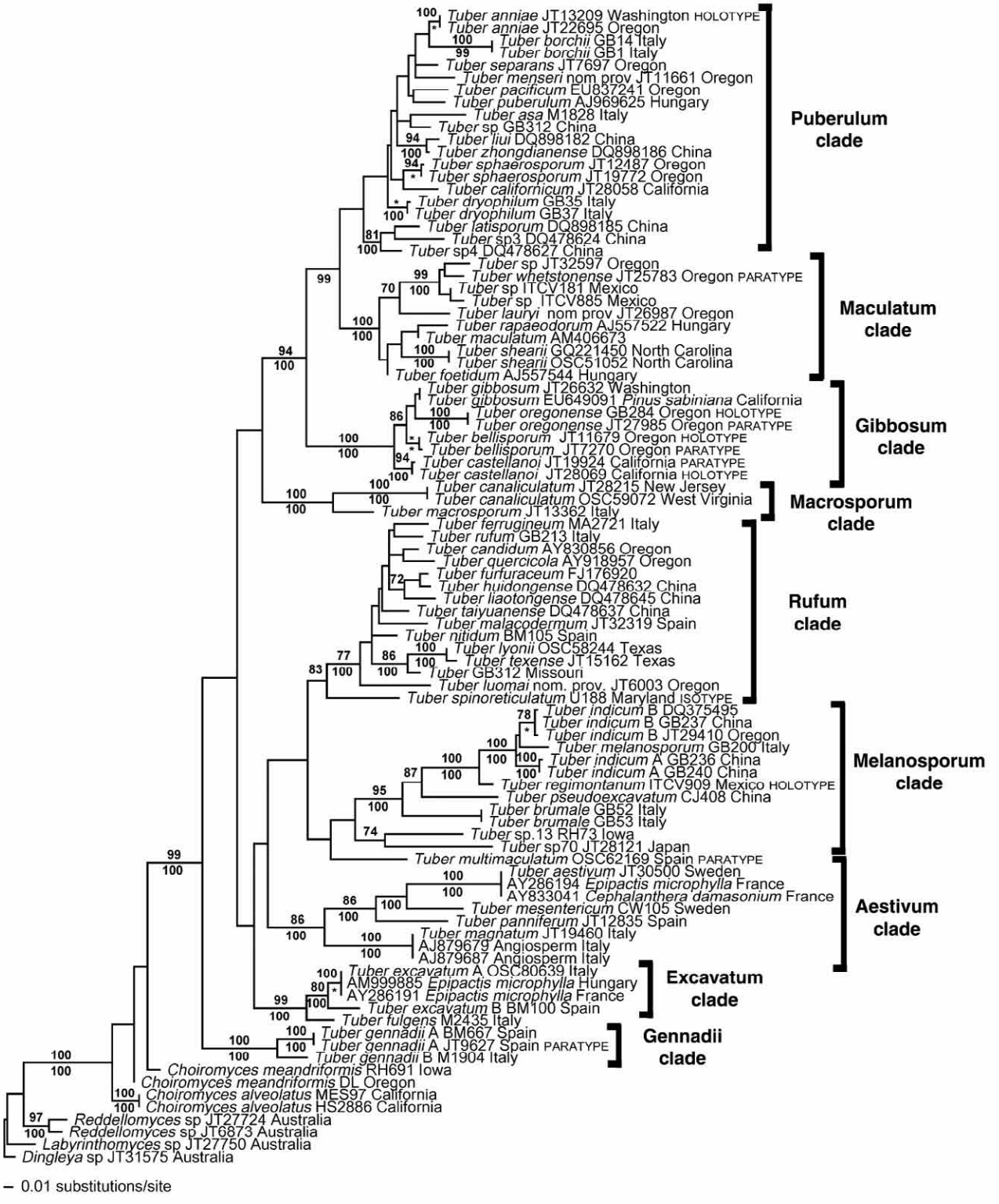

Abb. 9: Rekonstruktion des Stammbaums der Gattung *Tuber* auf Basis von nuklear-ribosomalen ITS (Internal Transcribed Spacer) Daten (Bonito et al. 2010b).

©Biologiezentrum Linz, Austria, download www.biologiezentrum.at

Abb. 10: *Tuber magnatum* ist die teuerste aller Trüffelarten. Der Markt wird bislang nur durch Wildsammlung beliefert.

Trüffel als Modell der Ektomykorrhiza-Forschung

Die wirtschaftliche Bedeutung der Trüffel, das Projekt der Trüffelkultur und die Rätselhaftigkeit der Lebensweise der Trüffel regten schon früh die Theoriebildung an – die erste Gattungsmonographie enstand bereits in der Renaissance (Ciccarello 1564). Im späten 19. Jahrhundert prägte der Forstwissenschafter B. Frank den Begriff Mykorrhiza als er, mit der Entwicklung der Trüffelkultur in Preussen beauftragt, erstmals die Struktur, Funktion und Bedeutung der Symbiose zwischen Mykorrhizapilzen und Baumwurzeln erkannte. (Frank 1885; Abb. 11). Abb. 12 zeigt die Ektomykorrhiza von *Tuber* aff. *puberulum* an *Picea abies*.

Trüffel und vergleichende Genomik

Mit der Entwicklung einer Trüffelkultur auf wissenschaftlicher Basis und rasanten Entwicklung der molekularbiologischen Forschung gewann in den letzten Jahrzehnten auch die Trüffelforschung wieder neues Moment. Über viele Jahrzente hatte die Grundlagenforschung auf wenige, möglichst einfach Modellorganismen fokussiert, deren Lebenszyklus sich im Labor in kurzer Zeit und mit wenig Aufwand reproduzieren ließ. Die Forschung an in Symbiose lebenden Organismen mit komplexen, zum Teil noch unaufgeklärten Lebenszyklen (Urban et al. 2004; Paolocci et al. 2006) ist im Vergleich dazu riskanter und zeitaufwändiger. Andererseits lassen sich die faszinierenden Mechanismen mutualistischer Interaktionen eben nicht an isolierten Modellorganismen studieren.

Die Fortschritte der Sequenziertechnologie und Bioinformatik haben es nun ermöglicht, ganze Genome sehr viel schneller und kostengünstiger zu sequenzieren als noch vor wenigen Jahren. Die ersten Pilzarten, deren Genome sequenziert wurden, waren Hefen, die schon lange als Modellorganismen der molekularen Genetik und Zellforschung gedient hatten. Es folgten andere biotechnologisch wichtige Pilzarten und pathogene Pilze, die als Schad- oder Krankheitserreger von Bedeutung sind, erst als letzte große ökologische Gruppe wurden Mykorrhizapilze und lichenisierte Pilze (Flechten) in Angriff genommen. Die Périgordtrüffel, *Tuber melanosporum*, war der erste Ektomykorrhiza (EM) bildende Askomyzet, dessen Genom veröffentlicht wurde (Martin et al. 2010).

Wie Gourmets ohnehin schon immer gewußt haben, zeigt die genetische Ausstattung von *T. melanosporum* ein sehr geringes allergenes Potential, Schlüsselenzyme der Mykotoxinsynthese fehlen ebenfalls. Wesentlich überraschender war der Befund, dass die Périgordtrüffel die Fähigkeit zur sexuellen Fortpflanzung hat – lange Zeit hatte man eine mehr oder weniger klonale Vermehrung vermutet.

Nach der Decodierung des Genoms von *T. melanosporum* war nicht zuletzt der Vergleich mit dem damals bereits vorliegenden Genom von *Laccaria bicolor* (Martin et al. 2008), einem Basidiomyzet (Ständerpilz) und ersten sequenzierten Ektomykorrhizapilz, von Interesse: Was ist diesen beiden Pilzar-

©Biologiezentrum Linz, Austria, download www.biologiezentrum.at

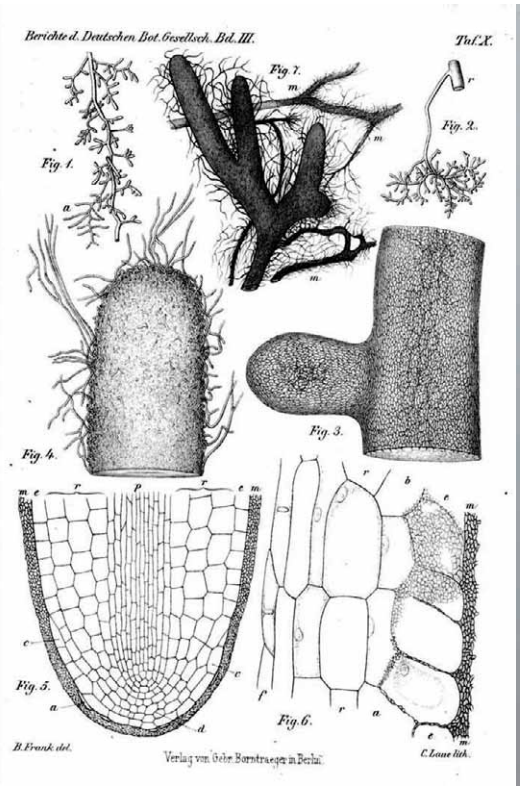

Abb. 11: Historische Abbildung von Ektomykorrhizen an *Fagus sylvatica* (Frank 1885)

Abb. 12: Ektomykorrhiza von *Tuber* aff. *puberulum* an *Picea abies*.

ten gemein, wie unterscheiden sie sich in ihrer genetischen Ausstattung von saprotrophen oder parasitischen Pilzen? Die Lebensweise als Ektomykorrhizapilz ist, nach heutigem Wissensstand, innerhalb der höheren Pilze vielfach unabhängig entstanden, es handelt sich also um konvergente Evolution (Tedersoo et al. 2010). Daher ist der Vergleich von Ektomykorrhizapilzen aus verschiedenen Verwandtschaftsgruppen, auch besonders aussagekräftig was die allgemeinen Eigenschaften der EM betrifft, denn die spezifischen Anpassung an die symbiotische Lebensweise lassen sich nicht auf einen gemeinsamen Ahnen zurückführen, sondern wurden unabhängig erworben. Damit ermöglicht die vergleichende Genomik in Verbindung mit Genexpressionsstudien direkte Einblicke in die Funktion der EM-Symbiose (Martin et al. 2010).

Ein Baum steht in der Regel mit einer Vielzahl an EM-Pilz-Arten in Symbiose, die zum Teil wirtsspezifisch sind, zum Teil aber auch verschiedene Baum- und andere Pflanzenarten unterirdisch vernetzen können. Die Vielfalt der potentiellen Partner und die Komplexität der entstehenden Netzwerke stellen werfen zahlreiche Fragen auf:

- Wie erkennen die Symbiosepartner einander, wie können die Bäume Mykorrhizapilze von Wurzelparasiten unterscheiden?
- Wie können Mykorrhizapilze die Wirtsbäume "besänftigen", also ihre gegen Parasiten gerichteten Abwehrreaktionen dämpfen?
- Welche physiologischen und anatomischen Veränderungen gehen mit der Etablierung der Symbiose einher?
- Wie wird der Nährstoffaustausch geregelt, wer profitiert wie sehr, wer hat die Kontrolle?
- Welche physiologische Basis liegt einer breiten bzw engen Wirtsspezifität zu Grunde?

Mobilisierung von Nährstoffen und Kontrolle des Stoffaustauschs

Eine mutualistische Symbiose ist nur dann gegeben, wenn beide Partner vom Austausch profitieren. Mykorrhiza ist ein klassisches Beispiel für einen trophischen Mutualismus, bei dem unterschiedliche Nährstoffe ausgetauscht werden. Ein hohes Maß an Komplementarität ist Voraussetzung für den evolutionären Erfolg einer Wechselbeziehung, diese Komplementarität ist bei Mykorrhiza gegeben: Pilze können viel effizienter als Pflanzenwurzeln mineralische Nährstoffe mobilisieren, dafür jedoch keine Photosynthese betreiben. Es ist daher für beide Seiten vorteilhaft bis überlebensnotwendig, die Symbiose einzugehen, solange die „Fairness" des Austauschs sichergestellt ist. Der Kontrolle über den Stoffaustausch ist daher der zentrale Regulationsmechanismus dieser Symbiose.

©Biologiezentrum Linz, Austria, download www.biologiezentrum.at

Das Genom von *Laccaria bicolor* ist besonders reich an Proteasen (Fungalysin, Metalloproteasen, Aspartylproteasen, Serinproteasen), damit kann das periphere Myzel stickstoffreiche organische Substanz im Boden zersetzen und den Stickstoff verfügbar machen (Plett & Martin 2011). Dieser Prozess ist energieaufwändig und wird durch die Energieversorgung seitens des Wirtsbaums ermöglicht. Eine Blockade der N-Aufnahme des Myzels destabilisiert die Symbiose und bestätigt die zentrale Rolle des Nährstoffaustauschs, sowie die effiziente Kontrolle durch die Wirtspflanze (Kemppainen et al. 2009).

In den Ektomykorrhizen sind bestimmte Genfamilien mit Bezug zum Nährstoffaustausch konstant hochreguliert – dies zählt zu den Gemeinsamkeiten von *Laccaria bicolor* und *Tuber melanosporum* (Plett & Martin 2011).

Verminderte Abbauleistung

Saprotrophe, saproparasitische und zT auch hemibiotrophe Pilze verfügen über ein reiches Arsenal an zellwandlösenden Enzymen. Dank dieser enzymatischen Ausstattung verfügen viele Pilzarten über die besonderes Fähigkeit, komplexe organische Substanz abzubauen und energetisch zu verwerten – eine Eigenschaft die auch für biotechnologische Anwendungen von großem Interesse ist. Die Hypothese einer massiven Reduktion zellwandauflösender Enzyme bei EM Pilzen wird durch die bislang vorliegenden genomischen Daten bestätigt, die beteiligten Genfamilien weisen die höchsten Verluste auf. Dabei finden sich jedoch spezifische Unterschiede zwischen *Laccaria bicolor* und *Tuber melanosporum*:

Laccaria bicolor verfügt über ein abgeschwächtes Arsenal zellwandabbauender Enzyme, das hauptsächlich im peripheren Myzel exprimiert wird, und im Kontaktbereich mit dem Wirt weitgehend supprimiert wird. Bei *Tuber melanosporum* ist die Ausstattung mit zellwandabbauenden Enzymen noch weiter vermindert, daraus lässt sich schließen, dass das Potential saprotrophen Wachstums noch geringer und die Abhängigkeit vom Wirtsbaum noch höher ist. Andererseits deutet eine starke Expression je einer Laccase, Tyrosinase und Lipase im symbiotischen Kontakt auf eine wesentlich aggresivere Kolonisierung des Wirtsgewebens hin. Es wird vermutet dass diese Enzyme bei der Etablierung des Hartig´schen Netzes, also beim Wachstum der Pilzhyphen zwischen den äußerstenen Zellen der Baumwurzeln und der Ausbildung einer Kontakt- und Austauschfläche, eine Rolle spielen.

Bei allen Unterschieden zwischen den beiden Modell-EM-Pilzen läßt sich die verminderte Rolle von zellwandlösenden Enzymen im Vergleich zu saprotrophen Pilzarten verallgemeinern. Dadurch reduzieren EM Pilze ihr Bedrohungspotential gegenüber den Wirtszellen vermindert und erhöhen zugleich ihre Abhängigkeit vom Wirt als Kohlehydratquelle. Für die Pflanzenzellen sind Zellwandabbauprodukte ein Alarmsignal. Durch ihre verminderte Aggressivität können EM-Pilze vermutlich leichter die Abwehrreaktionen des Wirtes deaktivieren (Plett & Martin 2011).

Signale – ein molekularer Dialog zwischen den Symbisosepartnern?

Der Übergang zum symbiotischen Zustand geht für beide Symbiosepartner mit wesentlichen anatomischen und physiologischen Veränderungen und sehr wahrscheinlich auch mit einem intensiven Signalaustausch einher. Einige der bei den Modell-EM-Pilzen festgestellten neuartigen oder expandierenden Genfamilien spielen vermutlich eine Rolle im Signalaustausch zwischen den Symbiosepartnern.

Bereits vor dem physischen Kontakt der Symbiosepartner findet eine wechselseitige Beeinflussung durch lösliche chemische Signale, wie zum Beispiel das Pflanzenhormon Auxin oder das analog wirkende Hypaphorin (Tryptophan-betain), die auch von EM-Pilzen synthetisiert werden, statt. Dadurch werden der Stoffwechsel im Pflanzengewebe und Wachstumsvorgänge beeinflusst, nicht zuletzt wird eine verstärkte Verzweigung der Feinwurzeln induziert, ein charakteristisches Merkmal von EM (Felten et al. 2009).

Transkriptom-Analysen fanden über 100 Pilzgene, die im symbiotischen Wirtskontakt vermehrt exprimiert werden. Diese codieren für Sekret-Proteine die in der Apoplastischen Kontaktzone Proteasen des Wirtes neutralisieren, (Mycocypin/Clitocypin) oder für die Oberflächen-Eigenschäften im Kontaktbereich verantwortlich sind: Lektine, Hydrophobine, etc. Wahrscheinliche Funktionen sind: molekulare Erkennung, Dämpfung der Wirtsabwehr. Koppelung der zellulären Signalkaskaden innerhalb und zwischen den Symbiosepartnern (Plett & Martin 2011).

L bicolor verfügt über Gene für hunderte SSPs (small secretes proteins, kleine Sekretproteine). Zehn dieser Gene die im symbiotischen Zustand hochreguliert werden (MiSSPs = Mykorrhiza induzierte SSPs) ähneln den Effektorproteinen von Phytopathogenen. Pflanzenparasiten wie der Maisbrand (*Ustilago maydis*) können mit Hilfe solcher Effektorproteine die Pflanzenabwehr umgehen (Doehlemann et al. 2009).

Die internen Signalkaskaden filamentöser Pilze beruhen – wie auch in tierischen Zellen - in hohem Maße auf Protein-Phosphorylierung durch Proteinkinasen. Im Genom von *Laccaria bicolor* finden sich 25 Tyrosin- und Tyrosinartige Kinasen, bei *Tuber melanosporum* sogar 42 (davon drei spezifisch f. *T. melanosporum*), verteilt auf zwei Gen-Familien. Bei saprotrophen Basidiomyceten wurden bislang nur bis zu vier dieser Kinasen gefunden. Dieser Typ von Kinasen weist damit den höchsten Grad an Ausdifferenzierung in Verbindung mit dem EM Lebensstil auf. Kinasen beeinflussen eine Vielzahl zellulärer Prozesse, sie sind auch maßgeblich in die Teilung und Ausdifferenzierung der Zellen involviert (Plett & Martin 2011).

©Biologiezentrum Linz, Austria, download www.biologiezentrum.at

Kontrolle der Pflanzen über die Energieversorgung der EM-Pilze

Wer kontrolliert das symbiotische Gleichgewicht, die Pflanze oder der Pilz? Experimentelle Daten belegen, dass beide Partner die Symbiose beenden können, wenn die Närstoffversogung stockt (Nehls et al. 2007; Kemppainen et al. 2009).

L. bicolor verfügt im Gegensatz zu den Wirtsbäumen über keine Invertase, kann daher die Sacharose der Wirtspflanze nicht in Trauben- und Fruchtzucker spalten und ist damit vollkommen abhängig von der Invertase des Wirts – der Wirt kann die Energieversorgung des Pilzes einfach über die Invertaseexpression steuern. Dies ist keineswegs ein Einzelfall, nur bei einem von 46 untersuchten EM Basidiomyzeten gelang es, ein Invertase-Gen nachzuweisen (Parrent et al. 2009). Das ist ein fundamentaler Unterschied zu phytopathogenen Pilzen, die in der Regel über mehrere Invertasen oder Saccharose-Transporter verfügen. *Tuber melanosporum* unterscheidet sich von den meisten EM-Basidiomyzeten durch den Bestand einer auch in Symbiose exprimierten Invertase (Martin et al. 2010). Es ist wahrscheinlich, dass die Wirtspflanzen über die Regulation der Energieversorgung der Mykorrhizapilze hinaus noch über andere Kontrollmechanismen verfügen.

Zusammenfassenfassend läßt sich feststellen, dass *L. bicolor* und *T. melanosporum* die Verminderung zellwandlösender Enzyme, ein ähnliches Set an Nährstofftransportern sowie eine außergewöhnliche Vielfalt an Tyrosinkinasen teilen. Es bestehen jedoch auch wesentliche Unterschiede zwischen den Genomen und Transkriptomen, etwa in der Präsenz einer in EM exprimierten Invertase bei *Tuber melanosporum*. Die bevorstehende Entschlüsselung weiterer Genome von EM Pilzen wird zeigen, inwieweit sich diese Ergebnisse verallgemeinern lassen.

Trüffel-Düfte

Es sind die flüchtigen Ausdünstungen der Trüffel, die ihr einzigartiges kulinarisches Renomée begründen. Über 200 verschiedene flüchtige Substanzen wurden bisher bei verschiedenen Trüffelarten festgestellt, und es ist wahrscheinlich, dass selbst bei den bestuntersuchten Arten noch nicht aller Komponenten entdeckt wurden (Culleré et al. 2010; Splivallo et al. 2011). Bei den meisten Verbindungen handelt es sich um kurzkettige Kohlenwasserstoffe, mit Alkohol-, Aldehyd- oder Ketongruppen, viele der charakteristischen Duftstoffe enthalten Schwefelatome. Bei schwefelhaltigen Volatile ist auch die menschliche Wahrnehmungsschwelle verhältnismäßig niedrig. Die Zusammensetzung des Bukkets variiert zwischen Arten und einzelnen Proben, die Reife und Frische der Trüffeln wie auch die Methodik der Analyse nehmen Einfluss auf Art und Anzahl der festgestellten Verbindungen (Splivallo et al. 2011).

Das Verhalten erfahrener Trüffelhunde deutet darauf hin, dass sie Trüffelarten am Geruch unterscheiden können. Je nachdem ob sie eine gesuchte oder eine nicht gesuchte Trüffelart gewittert haben, beginnen sie zu graben oder nicht. Sogar für das menschliche Geruchsempfinden sind die Unterschiede zwischen den Düften verschiedener Trüffelarten extrem – es ist viel einfacher, manche Trüffelarten am Geruch als am Aussehen zu erkennen. Trüffeldüfte lassen niemanden kalt: man liebt sie, oder lehnt sie ab. Während einige Arten bekanntermaßen zu den höchstgeschätzten Delikatessen zählen, gelten andere aufgrund ihres stechenden Geruchs, ihres bitteren Geschmacks oder ihrer gummiartigen Konsistenz als ungenießbar. Manche Arten mit sehr durchdringendem Geruch, wie zum Beispiel die Gekrösetrüffel (*Tuber mesentericum*) oder die Wintertrüffel (*Tuber brumale*) nehmen eine Zwischenstellung ein: sie gelten als weniger edel als die Périgordtrüffel, ihr intensives, wenn auch weniger harmonisches Parfum, das auch größerer Hitze widersteht, kann in der Küche von Vorteil sein.

Einige Aromastoffe sind allen oder den meisten bislang untersuchten Arten der Gattung Tuber gemein: die Schwefelverbindungen DMS (Dimethyl-Sulfid) und DMDS (Dimethyl-Disulfid), die Aldehyde 2-Methylbutanal (auch in Kaffee enthalten), 3-Methylbutanal sowie die Alkohole 2-Methyl-1-Propanol und 1-Octen-3-ol. 2-Methyl-4,5-dihydrothiophene hingegen wurde bislang nur bei *Tuber borchii* nachgewiesen (Splivallo et al. 2011). Auf Grund solcher Unterschiede ist es möglich, Trüffelarten auch durch die Analyse der Duftstoffe zu unterscheiden (Gioacchini et al. 2005). Weitere Untersuchungen zeigen, dass es soger innerhalb einer Art, *Tuber magnatum*, reproduzierbare Unterschiede zwischen geographischen Herkünften gibt (Gioacchini et al. 2008).

In welchem Ausmaß Umweltfaktoren oder genetische Faktoren die Variation des Aromas bedingen, ist noch nicht geklärt. Die Behauptung, dass bei bestimmten Wirtsbäumen die besten Trüffeln wachsen ist ein in der populären Trüffelliteratur beliebter Topos, der wissenschaftliche Beweis steht noch aus.

Trüffeldüfte und Wechselwirkungen mit anderen Organismen

Die ersten Untersuchungen des Trüffel-Aromas waren durch den kommerziellen Wert des Pilzes und durch die Absicht, das Aroma synthetisch nachzustellen, motiviert. Erst viel später begann man, auch die faszinierenden ökologischen Funktionen der Trüffel-Düfte, ihre Rolle in den für die Trüffel überlebenswichtigen Interaktionen zu untersuchen. Je nach Lebensstadum der Trüffel stehen andere Interaktionen im Vordergrund, und es werden verschiedene Volatil-Mischungen abgegeben:

©Biologiezentrum Linz, Austria, download www.biologiezentrum.at

Pflanzen

Es ist bereits gut erforscht, dass Pflanzen mit ihren Ausdünstungen an volatilen Verbindungen potenzielle Signale aussenden, die von den Signal-Empfängern beispielsweise als Warnung vor pflanzenfressenden Insekten aufgenommen werden können, zur frühzeitigen Induktion von Abwehrmechanismen (Baldwin et al. 2006) – was liegt näher als anzunehmen, dass Volatile auch in der Interaktion zwischen Pilzen und Pflanzen eine wesentliche Rolle spielen?

Manche der in Reinkultur (ohne Symbiosepartner) produzierten volatilen oder wasserlöslichen Moleküle, wie die Pflanzenhormone Ethylen und Indol-3-Esigsäure (IAA) können in Pflanzenwurzel physiologische und morphologische Veränderungen bewirken und im Fall eines geeigneten Wirtes die Etablierung der Symbiose begünstigen. Bei erhöhter Konzentration wirken die Pflanzenhormone Ethylen und IAA als Herbizide, die Hypothese, dass diese Signalstoffe auch an der Bildung der Brulés beteiligt seien, konnte bislang jedoch noch nicht bewiesen werden (Splivallo et al. 2011).

Wirbeltiere

Die Anlockung von Vektoren ist notwendige Voraussetzung für die Ausbreitung der Trüffelsporen. Trüffel können von einer Vielzahl von Säugetieren unterschiedlicher Größe, Verwandtschaft und Nahrungsgewohnheiten geortet werden, von Eichhörnchen bis zu Wildschweinen. Die Entdeckung von 5α-Androstenol im Truffelbukket (Claus et al. 1981), eines ursprünglich aus Eberhoden isolierten Duftstoffes mit moschusartigem Geruch, der auch als Sexualpheromon von Tieren und Menschen eine Rolle spielt (Kaminski et al. 2006), gab Spekulationen über die aphrodisierende Wirkung des Trüffelaromas neue Nahrung. Was die Ortung der Trüffel durch Trüffelhunde und Schweine betrifft, hat sich die flüchtige Schwefelverbindung Dimethyl-Sulfid jedoch als viel wirksamerer Signalstoff erwiesen (Talou et al. 1990). Ob manche Trüffelvektoren eine Vorliebe für bestimmte Trüffelarten bzw. Hypogäen mit bestimmten Duftqualitäten haben, ist derzeit noch wenig erforscht. Untersuchungen des Nahrungsspektrums von Kleinsäugern (Schickmann et al., unpubl.) zeigen jedoch, dass vor allem Rötelmäuse, aber auch Gelbhalsmäuse, Siebenschläfer und sogar die insektenfressenden Wühlmäuse einerseits die unterschiedlichsten Hypogäenarten verzehren, andererseits doch etwas unterschiedliche, wenn auch stark überlappende, Nahrungsspektren aufweisen.

Insekten

Trüffel werden von verschiedenen wirbellosen Tieren als Nahrungs- und Bruthabitat genutzt. Nackschnecken, Trüffelkäfer (*Leiodes cinnamomea*) und die Trüffelfliege (*Suillia pallida*) gelten bei Trüffelzüchtern als Schädlinge, da ihr Fraß den Wert der Trüffel mindert und das Risiko des Verderbs erhöht. Es ist möglich, dass auch Schnecken und Insekten zur Sporenausbreitung beitragen, allerdings deutet vieles darauf hin, dass ihr Verhältnis zu den Trüffeln eher parasitischer Natur ist. So können weibliche Trüffelkäfer die noch unreifen Trüffeln orten und werden andererseits nicht durch das charakteristische Trüffelaroma angelockt, dass erst bei Reife ausgebildet wird (Hochberg et al. 2003). Trüffelfliegen werden auch durch Dimethyl-Sulfid, einen wichtigen Bestandteil des Aromas reifer Trüffeln angelockt (Pacioni et al. 1991). Dies ist allerdings noch kein Beweis, dass es sich um ein mutualistisches Verhältnis handelt – dazu wäre der Nachweis der erfolgreichen Verbreitung keimfähiger Sporen erforderlich. Die Signale, die an mutualistische Partner gerichtet sind, bergen stets das Risiko, von nicht-mutualistischen oder parasitischen Organismen decodiert zu werden.

Das auffällige Revierverhalten der Trüffelfliege ermöglicht es erfahrenen Trüffelsuchern, Trüffelplätze ausfindig zu machen – dazu sind jedoch besonders geschärfte Naturkenntnis und Beobachtungsgabe erforderlich.

Interaktionen mit anderen Pilzarten

Die Périgordtrüffel nimmt im Bereich der Brulés eine dominante Stellung ein, die Präsenz anderer EM-Pilze ist vermindert (Napoli et al. 2010). Die Mechanismen dieser für EM-Pilze außergewöhnlichen Dominanz sind nicht geklärt, es ist zu testen, ob Volatile eine Rolle spielen (Splivallo et al. 2011).

Synthetisches Trüffelaroma und frische Trüffel

Talou et al. (1987) fanden bei *Tuber melanosporum* 14 Trüffelvolatile, von denen sie 9 als Komponenten des Trüffelaromas identifizierten. Keiner der Reinstoffe riecht wie die Périgordtrüffel, aber bereits mit der Mischung von 2 Komponenten, Dimethylsulfid und 2-Methylbutanal kann das Trüffelaroma imitiert werden. Bei *Tuber magnatum* genügt sogar eine einzige Hauptkomponente, Bis(methylthio)methane, zur Imitation des Aromas (Splivallo et al. 2011). Diese Erkenntnisse werden von der Nahrungsmittelindustrie in großem Umfang zur künstlichen Aromatisierung diverser "Trüffel"-Produkte verwendet. Die synthetischen Trüffelimitationen können sich jedoch in keiner Weise mit der Komplexität und Subtilität des natürlichen Trüffelaromas messen. Bedauerlicherweise verwenden viele Konsumenten synthetisch aromatisierte Produkte, vor allem sogenannte Trüffelöle, ohne jemals den Geschmack qualitativ hochwertiger frischer Trüffel kennengelernt zu haben. Manche Köche kombinieren sogar echte Trüffel und Trüffelöl, um den natürlichen Geschmack zu verstärken, und an Trüffeln zu sparen. Durch diese Praxis wird dem Kunden die Möglichkeit genommen, jemals den Geschmack unverfälschter Trüffel kennen zu lernen. Wer seine Geschmackssinne an die intensiven

©Biologiezentrum Linz, Austria, download www.biologiezentrum.at

Abb. 13: Trüffelhain in Umbrien, Italien. Der Boden wird oberflächlich bearbeitet, dadurch wird die Formation der *Brûlés* unterstützt.

künstlichen Aromastoffe gewöhnt hat, dem wird es schwerer fallen, das viel subtilere Trüffelaroma zu genießen, als jemandem, der noch nie Trüffel gegessen hat.

Biosynthese der Trüffel-Volatile

Die Tatsache, dass erst reife Trüffel ihr Aroma entfalten, in Verbindung mit der Beobachtung, dass sich bei Kulturversuchen viel eher Hefen oder Bakterien als Trüffelmyzelien entwickeln, sowie die Entdeckung von Endobakterien bei *Tuber borchii* (Barbieri et al. 2000) gaben Anlass zur Hypothese, dass zumindest ein Teil der Trüffel-Volatile von Mikroorganismen produziert wird, die in einer Art von Symbiose mit Trüffeln leben. Die Entschlüsselung des Genoms von *Tuber melanosporum* belegt hingegen, das zumindest diese Trüffelart über die essentiellen Biosynthesewege verfügt, um die wesentlichen Komponenten ihres Aromas eigenständig hervorzubringen (Martin et al. 2010).

Viele wichtige Duftkomponenten, lassen sich aus dem Katabolismus von Aminosäuren ableiten. Der Abbau von L-Methionine bis hin zu den Dimethylsulfiden kann über verschiedene Stoffwechselwege erfolgen. Aus dem Katabolismus von Aminosäuren ohne Schwefelatome können über den Ehrlich-Stoffwechselweg verzweigtkettige Kohlenwasserstoffe hervorgehen, derartige Verbindungen zählen zu den dominanten Trüffel-Volatilen. Gene für potentiell an diesem Stoffwechselweg beteiligte Enzyme konnten im Zuge der Genom-Decodierung identifiziert werden, ein experimenteller Nachweis für die Synthese dieser Trüffel-Volatile über den Ehrlich-Stoffwechselweg steht jedoch noch aus (Splivallo et al. 2011).

Die weit verbreiteten unverzweigten C8-Volatile entstammen dem Fettsäurestoffwechsel, und sind bei Pilzen von der in Trüffeln reichlich vorhandenen Linolsäure abgeleitet (Harki et al. 2006). Isoprenoide, auch Terpenoide genannt, sind nach den vorliegenden Daten bei weißen Trüffeln vielfältiger vertreten als bei schwarzen Trüffeln, bei *T. magnatum* wurden 24 verschiedene Isoprenoide gefunden (Gioacchini et al. 2008)"pl ainCitation":"(Gioacchini et al. 2008, 15 bei *T. borchii* (Zeppa et al. 2004). Die Synthese der Isoprenoide erfolgt mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit über den über Mevalonat-Stoffwechselweg, Gen-Kandidaten für alle potenziell in den Mevalonat-Stoffwechselweg involvierten Enzyme konnten im Genom von *Tuber melanosporum* nachgewiesen werden (Martin et al. 2010).

©Biologiezentrum Linz, Austria, download www.biologiezentrum.at

Wilde und kultivierte Trüffel, Landnutzung, Natur- und Artenschutz

Es mag überraschen, dass die goldene Zeit der Trüffel ins 19. Jht fiel, als die Praktiken der Trüffelkultur noch in den Kinderschuhen steckten und Wildsammlung dominierte. Zur besten Zeit lag die Produktion der Périgordtrüffel alleine in Frankreich bei über 1000 t, während gegenwärtig trotz des wissenschaftlich-technischen Fortschritts nur 50-100 t erreicht werden. Die moderne Trüffelkultur beruht auf der Auspflanzung von Wirtsbäumen, die unter kontrollierten Bedingungen mit definierten Trüffelarten mykorrhiziert werden ("Trüffelbäumchen"). Nach dem Auspflanzen kann es je nach Standort 4-10 Jahre dauern, bis erste Trüffel gebildet werden. Während es gegenwärtig möglich ist, relativ gleichmäßig intensiv mykorrhizierte Setzlinge zu produzieren, hängt der Erfolg im Feld von sehr vielen Umweltfaktoren und Pflegemaßnahmen ab. In Österreich gelang die erste Ernte einer kultivierten Trüffel 2008 (Urban et al. 2010), die Trüffelkultur befindet sich hierzulande nach wie vor in einem experimentellen Stadium.

Vieles deutet darauf hin, dass Trüffel in Kulturlandschaften mit traditioneller Nutzung besonders günstigen Lebensraum finden. Die moderne Landnutzung, mit scharfen Grenzen zwischen Intensivlandwirtschaft und geschlossenem Forst ist hingegen wenig vorteilhaft, da wichtige halboffene Lebensräume und Landschaftselemente, wie Waldränder, Baumgruppen und Einzelbäume auf Wiesen und Weiden zunehmend seltener werden.

Trüffelgärten als potenzielle Hotspots der Biodiversität?

Gegenwärtig können Trüffel nur unter naturnahen Bedingungen kultiviert werden, es ist erforderlich, den natürlichen Lebensraum der Trüffel so gut wie möglich zu kennen und zu simulieren. Im Zentrum steht die symbiotische Beziehung der Trüffel mit ihren Wirtsbäumen, die spezifischen Ansprüche an die Bodeneigenschaften sowie Wechselwirkungen mit anderen Pflanzen, Tieren und Pilzen und Bakterien spielen ebenfalls eine wesentliche Rolle. Ein Trüffelgarten ist viel komplexer und strukturreicher als einjährige Kulturen, und kann eher als agroforstwirtschaftliches Ökosystem verstanden werden (Abb. 13), vergleichbar den Korkeichenhainen und Olivenhainen des Mittelmeerraums oder den Streuobstwiesen Mitteleueropas.Diese agroforstwirtschaftlichen Ökosysteme zeichnen sich bei naturnaher Bewirtschaftung durch außergewöhnlichen Reichtum an zum Teil bedrohten Arten aus. Eine Vergleich der Vegetation von Trüffelgärten, Olivenhainen Ackerland und mediterranem Waldland in Südfrankreich zeigte dass sowohl Trüffelgärten als auch Olivenhaine besonders viele Arten relativ offener, jedoch wenig gestörter Standorte beherbergen, und damit ein wertvolle Refugien für die Arten der ehemals ausgedehnten Garrigue (mediterrane Busch-Steppe) bilden (Therville 2009).

Thermophile halboffene Waldgebiete, wie Waldsteppen sind Lebensraum für zahlreiche seltene und gefährdete Arten. Die Waldsteppe, bestehend aus Waldfragmenten, Waldsäumen und Steppenrasen kann edaphisch, klimatisch oder durch Nutzung bedingt sein. Im Osten Österreich prägten ausgedehnte Weiderasen untermischt mit Waldfragmenten vielerorts die Kultulandschaft. Im Laufe der Jahrhunderte verschoben sich die Grenzen zwischen Wald- und Weideland bis zur großflächigen Ausdehnung der Steppenvegatation im 17. und 18. Jahrhundert, um in der Folge durch ackerbauliche Nutzung, Aufforstung und Industrialisierung wieder zurückgedrängt zu werden (Hillebrand 2008). Trüffelhaine könnten neben den wenigen in Naturschutgebieten verbliebenen Magerrasen als wertvolle Sekundärhabitate für manche der aus der Kulturlandschaft verdrängten Arten dienen.

Vieles spricht dafür, dass Trüffelgärten in der Agrarlandschaft auch wichtige Ökosystemleistungen erfüllen können. Der Baumbestand bietet Erosions- und Windschutz, im Gegensatz zu landwirtschaftlichen Kulturen ist der Nährstoffentzug minimal. Die hohe Effizienz der Nährstoffaufnahme durch Ektomykorrhizapilze sorgt für ein nahezu verlustfreies Recycling der Nährstoffe und schützt das Grundwasser vor Nitratbelastung. Die in der Intensivlandwirtschaft üblichen Pestizide, vor allem Fungizide, und Düngemittel sind in der Trüffelkultur eher kontraproduktiv und sollten auf ein Minimum beschränkt werden. Aufgrund der geringen Belastung mit Düngemitteln und Pestiziden würden sich Trüffelhaine auch sehr gut als Pufferzone zwischen Naturschutzgebieten und Agrarland eignen. Die mittelfristige CO_2 Speicherung in der Biomasse ist ein weiterer positiver Nebeneffekt der Trüffelkultur.Eine Besonderheit der Trüffelkultur ist der außergewöhnlich hohe Kalkbedarf – Trüffel gedeihen in Böden, die für viele Kulturpflanzen zu basenreich sind. Es ist möglich, nach massiver Kalkzufuhr Trüffel auch in ursprünglich sauren Böden zu kultivieren – diese Praxis ist wegen des massiven Eingriffs in die betroffenen Standorte aus ökologischer Sicht eher fragwürdig, auch wenn sie lokal biodiversitätserhöhend wirken kann.

Mit zunehmendem Druck auf natürliche Trüffelvorkommen und -habitate nimmt auch die Bedeutung der Trüffelhaine als Refugium der Trüffel selbst zu (Urban & Pla 2010). Es besteht sogar die Möglichkeit, dass sich Trüffel ausgehend von Trüffelgärten auf natürlichem Wege neue Lebensräume erobern. Der Mensch ist mittels der Trüffelkultur zum wahrscheinlich wichtigsten Vektor der Trüffel geworden, und es ist anzunehmen, dass die durch die natürlichen Ausbreitungswege bedingte Populationsstruktur der Trüffelarten (Murat et al. 2004) zunehmend verwischt werden wird. Ein schwerwiegendes Risiko ist in diesem Zusammenhang die bereits dokumentierte (unbeabsichtigte) Ansiedelung exotischer Trüffelarten, im konkreten Fall von *Tuber indicum* (Murat et al. 2008). Diese Trüffelart ist zwar genießbar, aber bei weitem nicht so hochwertig wie die Périgord-Trüffel (*Tuber melanosporum*), könnte dieser jedoch Konkurrenz machen. Die Qua-

©Biologiezentrum Linz, Austria, download www.biologiezentrum.at

lität und Herkunft der mit Trüffel mykorrhizierten Bäume ist nicht zuletzt aus diesem Grund von entscheidender Bedeutung. Weitere Informationen über praktische Aspekte der Trüffelkultur finden sich auf www.trueffelgarten.at.

DANKSAGUNG

Ich danke dem FWF für die Förderung des Projektes "Kleinsäuger und die Verbreitung von Mykorrhizapilz-Sporen" sowie Susanne Schickmann für die Überlassung von Fotos.

LITERATUR

Akhmetiev MA, Beniamovski. VN (2009): Paleogene floral assemblages around epicontinental seas and straits in Northern Central Eurasia: Proxies for climatic and paleogeographic evolution. — Geologica Acta **7**: 297–309

Baldwin IT, Halitschke R, Paschold A, von Dahl CC, Preston CA (2006): Volatile Signaling in Plant-Plant Interactions: "Talking Trees" in the Genomics Era. — Science **311**: 812 –815.

Barbieri E, Potenza L, Rossi I, Sisti D, Giomaro G, Rossetti S, Beimfohr C, Stocchi V (2000): Phylogenetic Characterization and In Situ Detection of a Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides Phylogroup Bacterium in *Tuber borchii* Vittad. Ectomycorrhizal Mycelium. — Applied and Environmental Microbiology **66**: 5035 –5042.

Bidartondo MI, Burghardt B, Gebauer G, Bruns TD, Read DJ (2004): Changing partners in the dark: Isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. — Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **271**: 1799–1806

Bonito G, Trappe JM, Rawlinson P, Vilgalys R (2010a): Improved resolution of major clades within Tuber and taxonomy of species within the Tuber gibbosum complex. — Mycologia **102**: 1042–1057

Bonito GM, Gryganskyi AP, Trappe JM, Vilgalys R (2010b): A global meta-analysis of Tuber ITS rDNA sequences: species diversity, host associations and long-distance dispersal. — Molecular Ecology **19**: 4994–5008.

Ceruti A, Fontana A, Nosenzo C (2003): Le specie europee del genere *Tuber*: una revisione storica. Museo regionale di scienze naturali, Torino.

Ciccarello A (1564): Opusculum de Tuberibus. Ad instantiam Ludouici Bozetti. 68 pp.

Claus R, Hoppen HO, Karg H (1981): The secret of truffles: A steroidal pheromone? — Experientia **37**: 1178–1179.

Culleré L, Ferreira V, Chevret B, Venturini ME, Sánchez-Gimeno AC, Blanco D (2010): Characterisation of aroma active compounds in black truffles (Tuber melanosporum) and summer truffles (Tuber aestivum) by gas chromatography–olfactometry. — Food Chemistry **122**: 300–306.

Doehlemann G, Van Der Linde K, Assmann D, Schwammbach D, Hof A, Mohanty A, Jackson D, Kahmann R (2009): Pep1, a secreted effector protein of Ustilago maydis, is required for successful invasion of plant cells. — PLoS Pathogens **5**

Felten J, Kohler A, Morin E, Bhalerao RP, Palme K, Martin F, Ditengou FA, Legué V (2009): The ectomycorrhizal fungus laccaria bicolor stimulates lateral root formation in poplar and arabidopsis through auxin transport and signaling. — Plant Physiology **151**: 1991–2005

Ferdman Y, Aviram S, Roth-Bejerano N, Trappe JM, Kagan-Zur V (2005): Phylogenetic studies of Terfezia pfeilii and Choiromyces echinulatus (Pezizales) support new genera for southern African truffles: Kalaharituber and Eremiomyces. — Mycol. Res. **109**: 237–245.

Frank B (1885): Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. — Ber. Dt. Bot. Ges. **3**: 128–145

Gioacchini AM, Menotta M, Bertini L, Rossi I, Zeppa S, Zambonelli A, Piccoli G, Stocchi V (2005): Solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry: a new method for species identification of truffles. — Rapid Communications in Mass Spectrometry **19**: 2365–2370.

Gioacchini AM, Menotta M, Guescini M, Saltarelli R, Ceccaroli P, Amicucci A, Barbieri E, Giomaro G, Stocchi V (2008): Geographical traceability of Italian white truffle (Tuber magnatum Pico) by the analysis of volatile organic compounds. — Rapid Communications in Mass Spectrometry **22**: 3147–3153.

Harki E, Bouya D, Dargent R (2006): Maturation-associated alterations of the biochemical characteristics of the black truffle *Tuber melanosporum* Vitt. — Food Chemistry **99**: 394–400.

Hillebrand K (2008): Pannonische Trockenrasen in Österreich: Ausbreitung und Gefährdung durch den Menschen. GRIN Verlag, München.

Hochberg ME, Bertault G, Poitrineau K, Janssen A (2003): Olfactory orientation of the truffle beetle, *Leiodes cinnamomea*. — Entomologia Experimentalis et Applicata **109**: 147–153.

Jeandroz S, Murat C, Wang Y, Bonfante P, Tacon FL (2008): Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus *Tuber*, the "true truffles." — Journal of Biogeography **35**: 815–829.

Kaminski RM, Marini H, Ortinski PI, Vicini S, Rogawski MA (2006): The Pheromone Androstenol (5α-Androst-16-en-3α-ol) Is a Neurosteroid Positive Modulator of GABAA Receptors. — Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **317**: 694 –703.

Kemppainen M, Duplessis S, Martin F, Pardo AG (2009): RNA silencing in the model mycorrhizal fungus Laccaria bicolor: gene knock-down of nitrate reductase results in inhibition of symbiosis with *Populus*. — Environmental Microbiology **11**: 1878–1896.

Kinoshita A, Sasaki H, Nara K (2011): Phylogeny and diversity of Japanese truffles (*Tuber* spp.) inferred from sequences of four nuclear loci. — Mycologia **103**: 779–794.

Marjanović Ž, Grebenc T, Marković M, Glišić A, Milenković M (2010): Ecological specificities and molecular diversity of truffles (genus *Tuber*) originating from mid-west of the Balkan Peninsula. — Sydowia **62**: 67–87

Martin F et al. (2008): The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. — Nature **452**: 88–92

Martin F et al. (2010): Perigord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. — Nature **464**: 1033–1038.

Maser C, Claridge AW, Trappe JM (2008): Trees, truffles, and beasts: how forests function. — Rutgers University Press.

Murat C, Díez J, Luis P, Delaruelle C, Dupré C, Chevalier G, Bonfante P, Martin F (2004): Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonization routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*. — New Phytologist **164**: 401–411.

Murat C, Zampieri E, Vizzini A, Bonfante P (2008): Is the Perigord black truffle threatened by an invasive species? We dreaded it and it has happened! — New Phytologist **178**: 699–702.

Napoli C, Mello A, Borra A, Vizzini A, Sourzat P, Bonfante P (2010): *Tuber melanosporum*, when dominant, affects fungal dynamics in truffle grounds. New Phytologist **185**: 237–247.

Nehls U, Grunze N, Willmann M, Reich M, Kuester H (2007): Sugar for My Honey: Carbohydrate Partitioning in Ectomycorrhizal Symbiosis. — ChemInform **38**.

Neuner-Plattner I, Grabher T, Hall IR, Stöffler G, Griffin F, Haselwandter K (1999): A comparison of immunological assays for the identification of *Tuber* spp. and other edible ectomycorrhizal fungi. — Mycological Research **103**: 403–412.

Pacioni G, Bologna MA, Laurenzi M (1991): Insect attraction by *Tuber*: a chemical explanation. — Mycological Research **95**: 1359–1363.

Paolocci F, Rubini A, Riccioni C, Arcioni S (2006): Reevaluation of the Life Cycle of *Tuber magnatum*. — Appl Environ Microbiol **72**: 2390–2393

Parrent JL, James TY, Vasaitis R, Taylor AFS (2009): Friend or foe? Evolutionary history of glycoside hydrolase family 32 genes encoding for sucrolytic activity in fungi and its implications for plant-fungal symbioses. — BMC Evolutionary Biology **9**.

Plett JM, Martin F (2011): Blurred boundaries: lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes. — Trends in Genetics **27**: 14–22.

©Biologiezentrum Linz, Austria, download www.biologiezentrum.at

Roberts CD, LeGrande AN, Tripati AK (2009): Climate sensitivity to Arctic seaway restriction during the early Paleogene. — Earth and Planetary Science Letters **286**: 576–585

Selosse M-A, Faccio A, Scappaticci G, Bonfante P (2004): Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. — Microbial Ecology **47**: 416–426

Splivallo R, Ottonello S, Mello A, Karlovsky P (2011): Truffle volatiles: from chemical ecology to aroma biosynthesis. — New Phytologist **189**: 688–699.

Talou T, Delmas M, Gaset A (1987): Principal constituents of black truffle (*Tuber melanosporum*) aroma. — Journal of Agricultural and Food Chemistry **35**: 774–777

Talou T, Gaset A, Delmas M, Kulifaj M, Montant C (1990): Dimethyl sulphide: the secret for black truffle hunting by animals? — Mycological Research **94**: 277–278.

Tedersoo L, May TW, Smith ME (2010): Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. — Mycorrhiza **20**: 217–263.

Therville C (2009): Caractérisation de la place de la trufficulture dans le paysage naturel et culturel d´Uzès. Université des Sciences et Techniques Montpellier 2, France. Available at: http://www.masters-biologie-ecologie.com/ARTIO/IMG/pdf/Therville.Clara.stage.M2IEGB-2009.pdf [Accessed January 31, 2012].

Trappe JM, Claridge AW, Arora D, Smit WA (2008): Desert Truffles of the African Kalahari: Ecology, Ethnomycology, and Taxonomy. — Economic Botany **62**: 521–529.

Trappe JM, Claridge AW, Claridge DL, Liddle L (2008b): Desert Truffles of the Australian Outback: Ecology, Ethnomycology, and Taxonomy. — Economic Botany **62**: 497–506.

Urban A, Neuner-Plattner I, Krisai-Greilhuber I, Haselwandter K (2004): Molecular studies on terricolous microfungi reveal novel anamorphs of two *Tuber* species. — Mycological Research **108**: 749–758.

Urban A, Pla T (2010): Conservation strategies for *T. aestivum*. — Austrian Journal of Mycology **19**: 173–279

Urban A, Schickmann S, Kräutler K, Nopp-Mayer U, Krisai-Greilhuber I, Hackländer K (2010): Research on hypogeous fungi and first harvest of a cultivated truffle in Austria. — In: Atti del 3 Congresso Internazionale di Spoleto sul Tartuffo Universitá degli Studi di Perugia., p. 795–799.

Zeppa S, Gioacchini AM, Guidi C, Guescini M, Pierleoni R, Zambonelli A, Stocchi V (2004): Determination of specific volatile organic compounds synthesised during Tuber borchii fruit body development by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. — Rapid Communications in Mass Spectrometry **18**: 199–205.